

一株高效解钾菌的筛选、鉴定及发酵条件的优化*

李新新¹ 高欣欣¹ 陈 星² 卢维浩¹ 董彩霞³ 崔中利¹ 曹 慧^{1†}

(1 南京农业大学农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095)

(2 北京师范大学地理学与遥感科学学院, 北京 100875)

(3 南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095)

摘 要 为了寻求钾肥替代技术, 从江西红壤中筛选到一株解钾效率为 27.62% 的高效解钾菌株 G4, 结合菌落形态特征、生理生化特性、16S rDNA 序列分析, 初步鉴定为类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus* sp.); 通过单因素试验与正交试验对 G4 的发酵条件进行优化, 结果表明 G4 的最佳发酵条件为: 麦芽糖 1% (w/v)、蛋白胨 0.2% (w/v)、磷酸氢二钾₀.05% (w/v)、培养温度 25 °C、初始 pH7.5、装液量 80 ml/250 ml (250 ml 三角瓶装液量为 80 ml)、培养时间 48 h、接种量 7%。G4 有较强的解钾能力, 有望用于微生物肥料的开发。

关键词 解钾菌; 红壤; 筛选; 鉴定; 类芽孢杆菌; 发酵条件

中图分类号 S154.39 **文献标识码** A

钾是农作物生长必须的三种基本营养元素之一, 植物体内钾占干物质含量的 0.2% ~ 4.1%, 仅次于氮。在植物生长发育过程中, 钾参与了 60 种以上酶系统的活化、光合作用以及同化产物的运输、碳水化合物的代谢和蛋白质的合成等过程; 钾还能增强作物的抗病虫害、抗倒伏、抗旱和抗寒等抗逆能力, 从而能提高作物的产量和品质。据土壤普查资料显示, 我国约 70% 的耕地缺钾, 约 45% 的耕地严重缺钾, 我国肥料中的氮、磷、钾比例为 1:0.4:0.16, 远小于发达国家的 1:0.5:0.4, 这些已成为限制作物产量和品质提高的重要因素^[1]。我国钾资源相对匮乏, 已探明储量仅占世界储量的 0.66%, 且分布不均, 严重限制了钾肥的开发利用。2011 年, 我国钾肥进口达 600 万 t, 对外依赖度达到 60%^[2]。

硅酸盐细菌, 又称钾细菌, 是指能分解土壤中的硅铝酸盐等矿物, 将难溶性的钾、磷、硅转变为可溶性状态供植物吸收利用的一类微生物^[3], 此外它还能分泌多种植物激素促进植物生长。自 1950 年前苏联学者亚历山大罗夫从土壤中分离得到具有释放硅铝酸盐矿物中钾元素能力的硅酸盐细菌后, 人们就试图利用此微生物法来解决有效态钾缺乏

的状况。盛下放等^[4-5]分离筛选到具有高效解钾活性的硅酸盐细菌 NBT 菌株, 摇瓶培养培养 120 h, NBT 菌株的释钾量较对照增加 226.0%; 田间试验表明, 施用 NBT 菌剂的棉花产量较对照增加了 9.05%。Badr 等^[6]分离筛选到 6 株硅酸盐细菌, 其解钾效率相比对照增加 21% ~ 112%, 其中一株高效解钾菌株 SBS 盆栽试验显示, 在黏土、砂土、石灰土中, 施用该菌剂的高粱的干重较不施菌剂的对照分别高出 48%、65% 和 58%。虽然关于高解钾率的硅酸盐细菌已有报道, 但是其绝对解钾量还是很小的, 所以分离筛选高效解钾菌株仍是现在研究的重点之一。本研究从江西红壤土样中, 分离筛选高效解钾菌, 并对其进行了鉴定; 同时对菌株的发酵条件进行了优化, 为以后微生物肥料的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

土壤样品采自江西省高安市潘家村梨园, 采用三点取样法。用小铲除掉表层土, 取 10 ~ 20 cm 土层的土壤, 三点土样混合为 1 份, 共采集 10 份, 分别

* 公益性行业 (农业) 科研专项经费项目 (201203013) 资助

† 通讯作者, E-mail: hcao@njau.edu.cn

作者简介: 李新新 (1988—), 男, 山东济宁人, 硕士研究生, 主要从事微生物分子生态学。E-mail: 2010116048@njau.edu.cn

收稿日期: 2013-03-15; 收到修改稿日期: 2013-08-21

装入无菌袋,贴上标签,带回实验室,放入冰箱内 4 °C 保存。

1.2 培养基

硅酸盐细菌初筛培养基:亚历山大罗夫培养基^[7]:蔗糖 5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, Na₂HPO₄ 2 g, CaCO₃ 0.1 g, FeCl₃ 0.005 g, 钾长石粉 1.0 g(钾长石粉过 1 000 目,用去离子水浸泡过夜,然后再用去离子水反复冲洗,去除其中的可溶性的钾,最后阴干),去离子水 1.0 L。

硅酸盐细菌复筛培养基:种子液培养基:蔗糖 10 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, CaCO₃ 1.0 g, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g, NaCl 0.1 g, 酵母膏 0.5 g, K₂HPO₄ 2.0 g, pH 7.4, 去离子水 1.0 L。解钾培养基:蔗糖 10 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, CaCO₃ 1.0 g, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g, NaCl 0.1 g, 酵母膏 0.5 g, Na₂HPO₄ 2.0 g, 钾长石粉 10 g(规格,处理方法同上), pH 7.4, 去离子水 1.0 L。

1.3 主要仪器与试剂

Taq 聚合酶、pMD19-T 载体、DNA Marker、T4 连接酶、PCR 产物纯化试剂盒购自上海生工生物工程技术服务有限公司,引物合成和 DNA 测序由上海英骏生物技术有限公司完成,其他试剂为国产分析纯。电泳仪、PCR 仪购自 Bio-RAD 公司,紫外可见分光光度计购自岛津公司。

1.4 解钾菌的初筛

采用稀释涂布平板法,将 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 三个浓度梯度的土壤稀释液涂布到硅酸盐细菌初筛培养基上,30 °C 培养 3 ~ 4 d,挑取圆形、透明、表面湿润黏稠的大型菌落,进行平板划线纯化,反复进行 3 次,同时用显微镜观察菌落纯度,直至获得纯培养。

1.5 解钾菌的复筛

摇瓶培养:将种子液按 5% 接种量接种到 50 ml/250 ml 解钾复筛培养基,30 °C、180 r min⁻¹ 摇床培养 7 d。设加等量灭活种子液的对照处理,每个处理设 3 个重复。

发酵液的处理及解钾率的测定:发酵液的处理采用过氧化氢灰化法^[8]。取发酵处理液,用电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP-OES)测定其中的钾离子含量,然后计算出速效钾相对增加率:

$$a = \frac{\rho_1 - \rho_0}{\rho_0} \times 100\%$$

式中, a 为速效钾相对增加率(%); ρ_1 为样品中速效钾含量(mg L⁻¹)(接菌); ρ_0 为样品中速效钾含量(mg L⁻¹)(接灭活菌)。

1.6 解钾菌的鉴定

菌株形态和生理生化鉴定:参照文献[9]对菌株进行形态观察和生理生化试验。

菌株 16S rDNA 鉴定:采用菌落 PCR 扩增菌株的 16S rDNA。选用 16S rDNA 通用引物 27f: (5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3') 1492r: (5' - GGTACCTTGTTACGACTT - 3'), 扩增体系(25 μ l): 10 × Taq buffer 2.5 μ l, Mg²⁺ (25 mmol L⁻¹) 2.0 μ l, dNTP(2.5 mmol L⁻¹) 2.0 μ l, 引物(25 pmol μ l⁻¹) 各 0.5 μ l, Taq 酶 0.3 μ l, ddH₂O 17.2 μ l。反应条件:94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 循环 30 次, 72 °C 终末延伸 10 min, 10 °C 保温 10 min。

PCR 产物经回收试剂盒纯化,然后进行 T - A 克隆,挑取阳性克隆子送上海英骏生物技术有限公司进行测序。测序结果提交 Ribosomal Database Project(<http://rdp.cme.msu.edu/>) 数据库中进行序列比对分析,选取同源性较高的序列,利用 MEGA4.0 软件,基于邻接法(Neighbor Joining method)构建菌株系统发育进化树。

1.7 菌株培养基的优化

不同碳源、氮源、无机盐的优化:选用复筛解钾培养基做为基础培养基,用葡萄糖、蔗糖、果糖、木糖、乳糖、可溶性淀粉、甘露醇、麦芽糖分别代替培养基中的碳源,加入量为 1%;用蛋白胨、酵母膏、氯化铵、硝酸钾、硫酸铵、尿素分别代替培养基中的氮源,加入量为 0.1%;用硫酸镁、氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钾、磷酸氢二钠、氯化镁、硫酸钾、硫酸钠分别代替培养基中的所有无机盐,加入量为 0.05%;培养条件为装液量 50 ml/250 ml, 接种量 7%, 30 °C、180 r min⁻¹ 摇床培养 48 h, 每个处理设 3 个重复,测量菌液 OD₆₀₀ 值,得出最佳碳源、氮源和无机盐。

最佳碳源、氮源、无机盐的浓度优化:选用复筛解钾培养基做为基础培养基,设最佳碳源的浓度为 0.5%、1.0%、1.5%;最佳氮源的浓度为 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%;最佳无机盐的浓度为 0.01%、0.05%、0.1%;培养条件为 50 ml/250 ml, 接种量 7%, 30 °C、180 r min⁻¹ 摇床培养 48 h, 每个处理设 3 个重复,测量菌液 OD₆₀₀, 得出最佳碳源、氮源和无机盐的浓度。

1.8 菌株培养条件的优化

选用复筛解钾培养基做为基础培养基,对培养温度、装液量、培养时间、初始 pH、接种量进行单因

素优化试验。在以上试验的基础上,按正交试验 $L_{18}(3^7)$ 七因素三水平对菌株摇瓶培养条件进行优化,每组试验设 3 个重复。

1.9 数据处理

利用 IBM SPSS Statistics 19.0 统计软件对实验结果进行统计分析。

2 结果与讨论

2.1 解钾菌的筛选

从硅酸盐细菌培养基平板上初步筛选到 52 株菌,从中又挑选出菌落形态大、生长速度快的 12 株菌,依次命名为 G1 - G12。

对初筛的 12 株菌进行摇瓶释钾试验,测定其解钾效率。12 株菌的解钾效率在 3.89% ~ 27.62% 之间,G4 的解钾效率最高,为 27.62%。与李海龙等^[10]从土壤中分离的芽胞杆菌 QL21 的解钾率 25.1%,及赵飞等^[11]从钾矿物表面分离 2 株菌解钾率 29.8% 和 25.4% 相当,因此选择菌株 G4 作为研究对象,用于后续研究。

2.2 菌株 G4 的鉴定

菌株 G4 在硅酸盐细菌培养基上的菌落及菌体形态见图 1。G4 菌落呈圆形,边缘整齐,透明凸起,表面湿润,菌落黏稠,菌落挑起时有弹性,可拉成丝。经革兰氏染色,呈阳性,菌体椭圆形,产有椭圆形芽孢和肥大的荚膜。G4 的生理生化特性见表 1。

对菌株 G4 进行 16S rDNA 的 PCR 扩增,0.75% 琼脂糖凝胶电泳验证,得到一条 1 600 bp 左右的条带,将其测序,得到 1 575 bp 的序列,序列信息提交 Genbank,获得登陆号 KC465416,通过 Ribosomal Database Project 数据库,下载同源性较高的序列,利用 MEGA4.0 基于邻接法 (Neighbor Joining method) 构建菌株系统发育进化树 (见图 2)。可以看出 G4 与 *Paenibacillus sabiniae* T49 (DQ338446) 聚于同一个分

支上,序列相似性达 99%,结合形态观察和生理生化特性,G4 初步鉴定为类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus* sp.) 菌株,此菌株与袁文功等^[12]分离的一株解钾菌分类地位相同。

对于硅酸盐细菌的系统发育分类地位,目前国际公认的硅酸盐菌种主要包括:胶质芽孢杆菌 (*Bacillus mucilaginosus*)^[13]、环状芽孢杆菌 (*Bacillus circulans*)^[14]、土壤芽孢杆菌 (*Bacillus edaphicus*)^[15]。但是,近些年国内外学者分离的硅酸盐细菌却呈现多样性:易浪波等^[16]从湖南省钾长石矿区分离出 4 株解钾菌,分属于芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.)、固氮菌属 (*Azotobacter* sp.)、微杆菌属 (*Microbacterium* sp.); 吴凡等^[17]从桑树根际土壤中分离获得 7 株解钾能力较强的菌株,分属于中华根瘤菌属 (*Sinorhizobium* sp.)、根瘤菌属 (*Rhizobium* sp.)、慢生根瘤菌属 (*Mesorhizobium* sp.)、屈挠杆菌属 (*Flexibacter* sp.) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.); Hu 等^[18]从浙江省天目山分离筛选到 2 株解钾菌,均属于胶质类芽孢杆菌 (*Paenibacillus mucilaginosus*)。解钾菌在表型特征和系统发育上的多样性,表明自然界中存在着丰富的解钾菌资源,为筛选到具有特殊功能 (耐盐和耐碱^[19]、拮抗作用^[20]) 的高效解钾菌提供了可能。

2.3 菌株 G4 培养基优化

不同碳源及最佳碳源浓度的优化。在供试的 8 种碳源中,G4 在以麦芽糖为碳源时,生长最好,其次是淀粉,葡萄糖最差 ($p < 0.01$,见图 3),由此可以看出 G4 对双糖和多糖的利用效率较单糖好。在选择麦芽糖作为最佳碳源时,当其浓度为 1.0% 时,G4 的生长状况最好 ($p < 0.01$,见图 3),碳源浓度的过高过低均不利于微生物的生长。过低的碳源浓度,无法保证为微生物提供充足的能量,而过高的碳源浓度则提高了培养基中的渗透压,不利于微生物的生长。

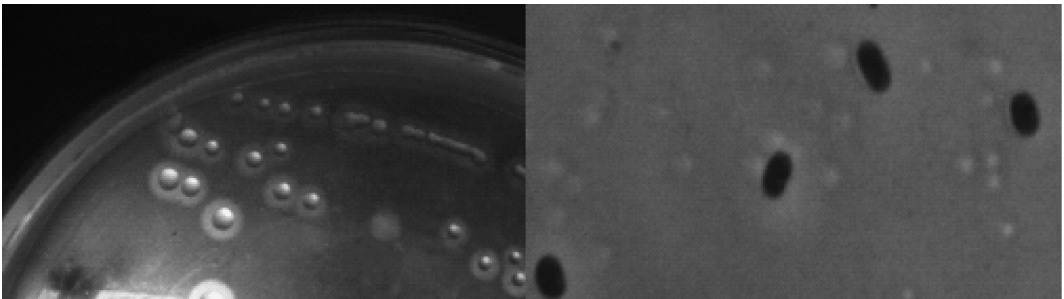


图 1 菌株 G4 在硅酸盐细菌培养基上的菌落形态与菌体形态

Fig. 1 Morphologies of G4 colonies and cells on Si medium

表 1 菌株 G4 的生理生化特性

Table 1 Physiological and biochemical features of Strain G4

特征 Feature	结果 Result	特征 Feature	结果 Result
糖发酵试验(葡萄糖) Sugar fermentation test	+	产硫化氢试验 Hydrogen sulfide test	—
甲基红试验 Methyl red test	—	脲酶试验 Urease test	—
V. P 试验 V. P test	—	过氧化氢酶试验 Catalase test	+
明胶液化试验 Gelatin liquefaction test	—	氧化酶试验 Oxidase test	+
淀粉水解试验 Starch hydrolysis test	+	卵磷脂酶试验 Lecithinase test	+
柠檬酸盐利用试验 Citrate utilization test	+	产吲哚试验 Indole test	—

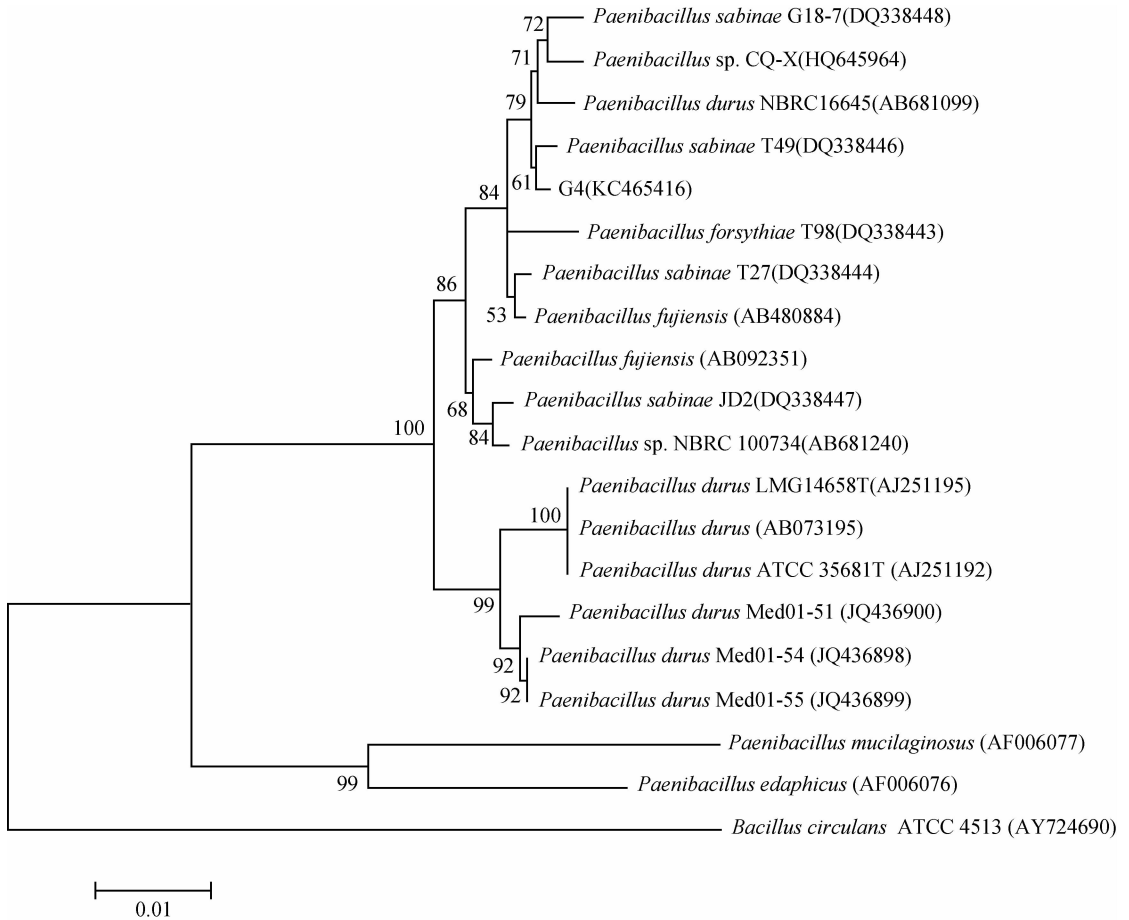


图 2 基于 16S rDNA 序列菌株 G4 的系统发育进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of Strain G4 based on 16S rDNA sequences

不同氮源及最佳氮源浓度的优化。在供试的 6 种氮源中, G4 在以蛋白胨为氮源时, 生长最好, 其次是酵母膏, 尿素最差 ($p < 0.01$, 见图 4), 由此可以看出 G4 对有机氮的利用率好于无机氮。在选择蛋白胨作为最佳氮源时, 当其浓度为 0.2% 时, G4 的生长状况最好 ($p < 0.01$, 见图 4)。

不同无机盐及最佳无机盐浓度的优化。在供试的 8 种无机盐中, G4 在以磷酸氢二钾为无机盐

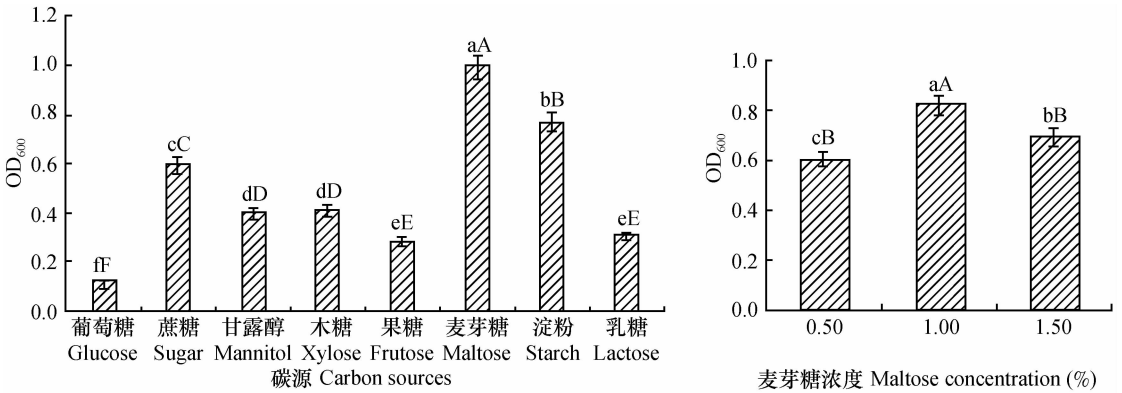
时, 生长最好, 其次是磷酸氢二钠, 氯化钾最差 ($p < 0.01$, 见图 5)。在选择磷酸氢二钾为最佳无机盐时, 当其浓度为 0.05% 时, G4 的生长状况最好 ($p < 0.01$, 见图 5)。

2.4 菌株 G4 培养条件优化

选择培养温度、装液量、培养时间、初始 pH、接种量五个因素, 每个因素设定合适的水平数, 对菌株 G4 进行培养条件单因素优化, 对所得数据进行

单因素方差分析,结果见图 6。由图可知,菌株 G4 最优的单因素培养条件为:装液量 60 ml/250 ml,培

养温度 30 ℃,接种量 7%,培养时间 48 h,初始 pH7.5。



注: 图中不同小写字母表示差异显著($p<0.05$), 不同大写字母表示差异极显著($p<0.01$), 下同 Note: Different lower-case letters in the figure represent significant differences ($p<0.05$). Different uppercase letters represent extremely significant differences ($p<0.01$). The same blow

图 3 不同碳源及麦芽糖不同浓度对菌株 G4 生长的影响

Fig. 3 Effects of carbon source and concentration of Maltose on growth of Strain G4

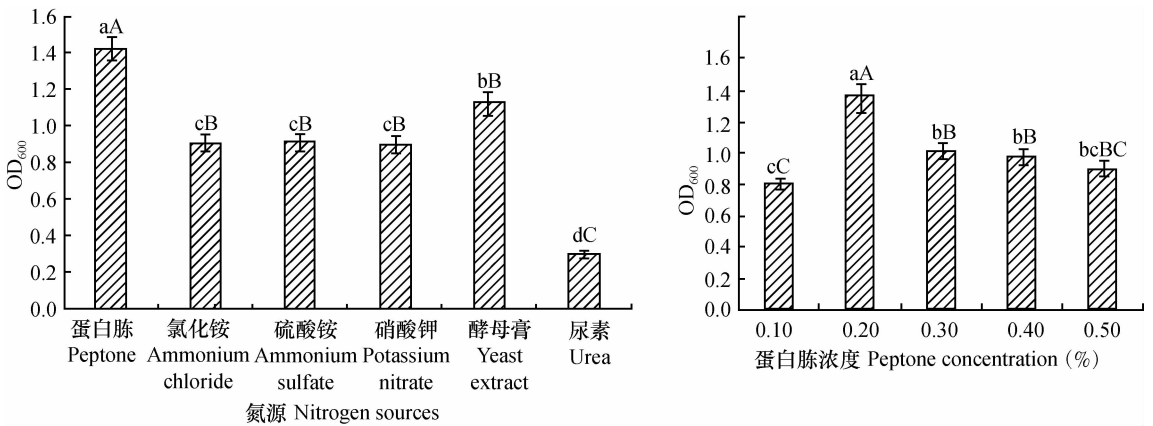


图 4 不同氮源及蛋白胨不同浓度对菌株 G4 生长的影响

Fig. 4 Effects of nitrogen source and concentration of peptone on growth of Strain G4

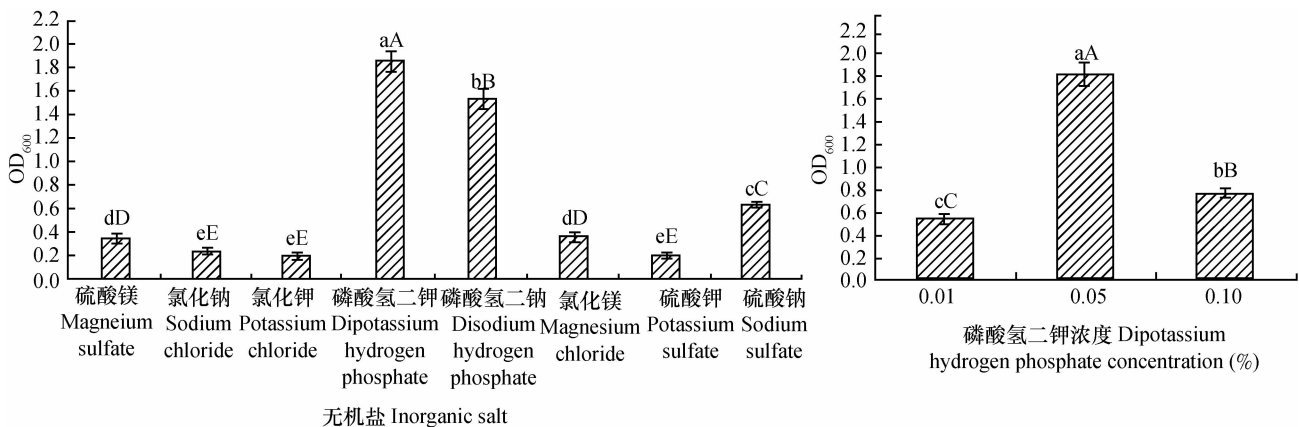


图 5 不同无机盐及磷酸氢二钾不同浓度对菌株 G4 生长的影响

Fig. 5 Effects of inorganic salt and concentration of dipotassium hydrogen phosphate on growth of Strain G4

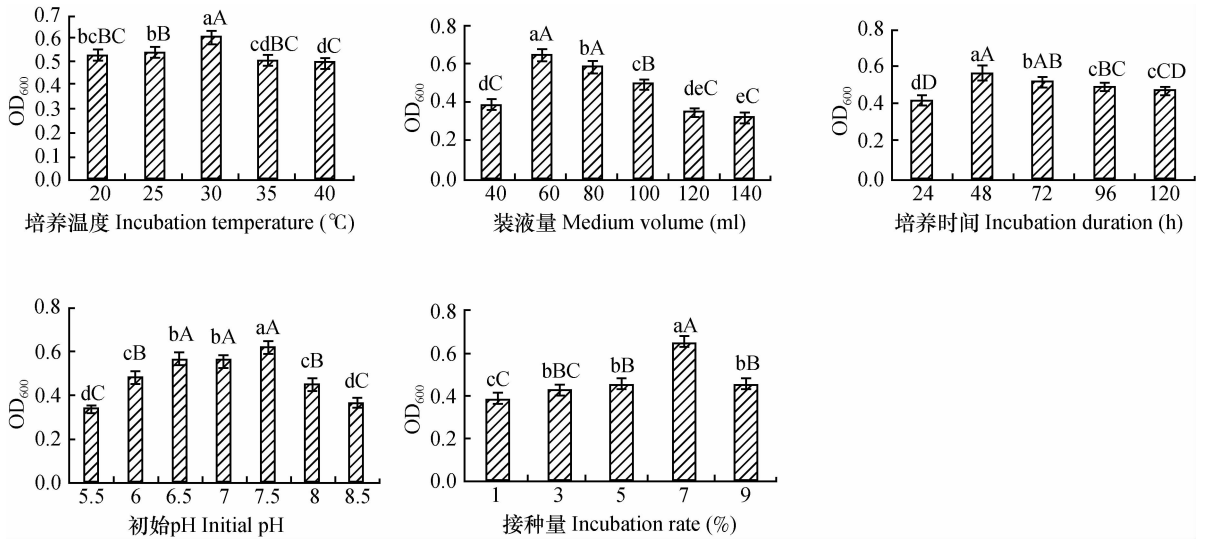


图 6 不同培养条件对菌株 G4 生长的影响

Fig. 6 Effects of incubation conditions on growth of Strain G4

根据单因素实验结果,选择合适的因素和水平(见表 2),按正交试验 $L_{18}(3^7)$ 对 G4 菌株摇瓶培养条件(培养温度、装液量、培养时间、初始 pH、接种量)进行优化,每个处理 3 个重复,对所得数据应用 SPSS19.0 进行方差分析,结果见表 3。由表可知,五个因素对实验结果影响的强弱顺序为:C(培养时间) > A(培养温度) > D(初始 pH) > B(装液量) >

E(接种量);结合单因素统计量表(未给出)可得,菌株 G4 的最佳摇瓶培养条件组合为 $A_2B_2C_1D_3E_2$,即装液量 80 ml/250 ml,培养温度 25 °C,接种量 7%,培养时间 48 h,初始 pH7.5。正交试验结果与单因素试验结果存在差异,说明培养条件各因素之间存在着交互作用,正交试验结果更具有说服力。

表 2 发酵条件正交试验的因素和水平的设计

Table 2 Factors and levels designed for the orthogonal test of G4 for incubation condition

水平 Level	因素 Factor				
	培养温度 Incubation temperature(°C)	装液量 Medium volume (ml)	培养时间 Incubation duration (h)	初始 pH Initial pH	接种量 Incubation rate(%)
1	20	60	48	6.5	5
2	25	80	72	7.0	7
3	30	100	96	7.5	9

表 3 正交试验的方差分析

Table 3 Variance analysis of the results of the orthogonal test

源 Source	Ⅲ型平方和 Type III Sum of Squares	df	均方 Mean Square	F	Sig.
校正模型 Corrected Model	0.125a	10	0.012	23.909	0.000
截距 Intercept	15.973	1	15.973	30626.593	0.000
A ¹⁾	0.035	2	0.018	33.555	0.000
B ²⁾	0.004	2	0.002	3.763	0.031
C ³⁾	0.071	2	0.035	67.976	0.000
D ⁴⁾	0.013	2	0.007	12.475	0.000
E ⁵⁾	0.002	2	0.001	1.776	0.182
误差 Error	0.022	43	0.001		
总计 Total	16.120	54			
校正的总计 Corrected Total	0.147	53			

1) A:培养温度 Incubation temperature;2) B:装液量 Medium volume;3) C:培养时间 Incubation duration;4) D:初始 pH Initial pH;5) E:接种量 Incubation rate

3 结 论

本研究从江西红壤采样,筛选到一株解钾效率为 27.62% 的高效解钾菌株 G4,初步鉴定为类芽孢杆菌属(*Paenibacillus* sp.);单因素试验与正交试验相结合得出菌株 G4 最佳发酵条件为:麦芽糖 1%、蛋白胨 0.2%、磷酸氢二钾 0.05%、培养温度 25 ℃、初始 pH7.5、装液量 80 ml/250 ml、培养时间 48 h、接种量 7%。此发酵条件是在实验室条件下应用摇瓶试验完成的,并未考虑成本问题,菌株如果应用到实际生产,还应综合考虑各方面因素,在保证菌株效果的前提下,选用廉价原料和合适的培养条件,使菌剂的生产效益最大化。G4 有望与钾矿石粉联合施用,为解决我国缺钾土壤提供一种可行措施。

参 考 文 献

- [1] 马鸿文. 中国富钾岩石:资源与清洁利用技术. 北京:化学工业出版社,2010:2—10. Ma H W. Potassic rocks in China: Resource and clean utilization techniques (In Chinese). Beijing: Chemical Industry Press, 2010:2—10
- [2] 商照聪,刘刚,包剑. 我国钾资源开发技术进展与展望. 化肥工业,2012(4):5—8. Shang Z C, Liu G, Bao J. Progress and prospect of technology for development of potassium resources in China (In Chinese). Chemical Fertilizer Industry, 2012(4):5—8
- [3] Aleksandrov V G, Blagodyr R N, Llev I P. Liberation of phosphoric acid from apatite by silicate bacteria. Mikrobiolohichniy Zhurnal (Kiev), 1967, 29:111—114
- [4] 盛下放,黄为一,曹晓英. 硅酸盐细菌 NBT 菌株解钾效能及对钾的吸持作用. 植物营养与肥料学报,2001,7(4):459—466. Sheng X F, Huang W Y, Cao X Y. Dissolution of feldspar and potassium uptake by the strain NBT of silicate bacterium (In Chinese). Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2001, 7(4):459—466
- [5] 盛下放,黄为一,殷永娟. 硅酸盐菌剂的应用效果及其解钾作用的初步研究. 南京农业大学学报,2000,23(1):43—46. Sheng X F, Huang W Y, Yin Y X. Effects of application of silicate bacterium fertilizer and its potassium release (In Chinese). Journal of Nanjing Agricultural University, 2000, 23(1):43—46
- [6] Badr M A, Shafei A M, Sharaf El-Deen S H. The dissolution of K and P-bearing minerals by silicate dissolving bacteria and their effect on sorghum growth. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 2006, 2(1):5—11
- [7] 中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究法. 北京:科学出版社,1985. Department of Microorganism, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences. Research methods of soil microorganisms (In Chinese). Beijing: Science Press, 1985
- [8] 陈华葵. 微生物学实验. 北京:农业出版社,1962. Chen H K. Microbiology experiment (In Chinese). Beijing: Agriculture Press, 1962
- [9] 东秀珠,蔡妙英,等. 常见细菌系统鉴定手册. 北京:科学出版社. 2001:349—384. Dong X Z, Cai M Y, et al. Manual of common systematic determinative bacteriology (In Chinese). Beijing: Science Press, 2001:349—384
- [10] 李海龙,谷洁,张宏斌,等. 秦岭山区硅酸盐细菌的分离、筛选以及初步鉴定. 西北农业学报,2011,20(4):194—199. Li H L, Gu J, Zhang H B, et al. Screening and elementary identification of silicate bacteria from Qinling Mountains (In Chinese). Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2011, 20(4):194—199
- [11] 赵飞,盛下放,黄智,等. 山东地区钾矿物分解细菌的分离及生物学特性. 生物多样性,2008,16(6):593—600. Zhao F, Sheng X F, Huang Z, et al. Isolation of mineral potassium-solubilizing bacterial strains from agricultural soils in Shandong Province (In Chinese). Biodiversity Science, 2008, 16(6):593—600
- [12] 袁文功,秀玲,邓伟,等. 一株硅酸盐细菌的分离及解钾活性研究. 中国微生态学杂志,2012,24(3):226—229. Yuan W G, Xiu L, Deng W, et al. Isolation and potassium release activity of a silicate bacterium strain (In Chinese). Chinese Journal of Microecology, 2012, 24(3):226—229
- [13] Avankyan Z A, Pivovarov T A, Karavaiko G I. Properties of a new species, *Bacillus mucilanginosus*. Mikrobiologiya, 1986, 55:477—482
- [14] Zahra M K, Monib M, Abdel-AL Sh I, et al. Significance of soil inoculation with silicate bacteria. Zentralblatt fur Mikrobiologie, 1984, 139(5):349—357
- [15] Shelobolina E S, Avakyan Z A, Bulygina E S, et al. Description of a new species of mucilaginosis bacteria, *Bacillus edaphicus* sp. nov. and confirmation the taxonomic status of *Bacillus mucilanginosus*. Mikrobiologiya, 1997, 66:813—822
- [16] 易浪波,彭清忠,何齐庄,等. 高效钾长石分离菌株的筛选、鉴定及解钾活性研究. 中国微生态学杂志,2012,24(9):773—776. Yi L B, Peng Q Z, He Q Z, et al. Isolation and identification of potash feldspar-solubilizing bacteria and their potassium-releasing activities (In Chinese). Chinese Journal of Microecology, 2012, 24(9):773—776
- [17] 吴凡,刘训理,张楠,等. 桑树根际硅酸盐细菌的分离鉴定及解钾能力测定. 蚕业科学,2010,36(2):323—329. Wu F, Liu X L, Zhang N, et al. Isolation and identification of mulberry rhizospheric silicate bacteria and determination of their potassium-releasing activities (In Chinese). Acta Sericologica Sinica, 2010, 36(2):323—329
- [18] Hu X F, Chen J S, Guo J F. Two phosphate- and potassium-solubilizing bacteria isolated from Tianmu Mountain, Zhejiang, China. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2006, 22:983—990
- [19] 杨剑芳,黄明勇,李杨,等. 盐碱土硅酸盐细菌多样性初步研究. 中国农学通报,2010,26(20):193—199. Yang J F, Huang M Y, Li Y, et al. Preliminary study on diversity of silicate bacteria from saline-alkali soil (In Chinese). Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(20):193—199

[20] 韩梅,王东,林荣峰,等. 具有拮抗作用的硅酸盐细菌的分离与筛选. 土壤通报,2011,42(1):77—80. Han M, Wang D, Lin R F, et al. Isolation and screening of antagonistic silicate bacteri-

um (In Chinese). Chinese Journal of Soil Science, 2011, 42(1): 77—80

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF AN EFFICIENT STRAIN OF POTASSIUM-DISSOLVING BACTERIA AND OPTIMIZATION OF ITS INCUBATION CONDITION

Li Xinxin¹ Gao Xinxin¹ Chen Xing² Lu Weihao¹ Dong Caixia³ Cui Zhongli¹ Cao Hui^{1†}

(1 Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Microbiology Department, College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

(2 School of Geography, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

(3 College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract In seeking for alternatives of potash fertilizer, a strain of potassium-dissolving bacteria coded as G4 was isolated from the red earth in Jiangxi Province. The strain of bacteria is very efficient in dissolving potassium, reaching 27.62% in potassium dissolving rate. G4 was tentatively identified as *Paenibacillus* sp. based on its morphological, physiological and biochemical features and its 16S rDNA sequence analysis. A single factor experiment and an orthogonal experiment was performed on the strain and found its optimal incubation conditions were maltose 1% (w/v), peptone 0.2% (w/v), dipotassium hydrogen phosphate 0.05% (w/v), temperature 25 °C, initial pH 7.5, medium volume 80 ml in a 250 ml flask, duration of the incubation 48 h and inoculation rate 7%. Strain G4 is quite good at dissolving potassium, and has the potential to be used in development of microbial fertilizer.

Key words Potassium-solubilizing bacteria; Red earth; Isolation; Identification; *Paenibacillus* sp.; Incubation condition

(责任编辑:陈德明)